

## インフルエンザウイルスのマウス馴化株と 非馴化株による IFN および IL-1 産生

戸 津 川 清

(山形大学農学部生物機能調節学講座)

(平成4年9月1日受理)

### Production of IFN and IL-1 by the Infection with Mouse Adapted and Non Adapted Virus

Kiyoshi TOTSUKAWA

Section of Bioprocess Engineering, Faculty of Agriculture,  
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan

(Received September 1, 1992)

#### Summary

In order to elucidate the adaptation of mice to the swine influenza virus strain, IFN and IL-1 activity in mouse lung were examined with adapted and non adapted virus.

The results were as summarized below :

1. Inflammatory cells after the infection with adapted virus (P10) were chiefly consisted of macrophages and lymphocytes.
2. Interferon in mouse lung by intranasal inoculation with adapted virus (P10) produced remarkably higher than that with non adapted virus (P0).
3. The production of interferon in lavage fluid of mouse bronchiole showed the similar trend at the mouse lung homogenates after the infection with P10 and P0 virus.
4. Interleukin-1 (IL-1) production after the infection with P10 virus was higher than that with P0 virus after 1 day.

#### 緒 言

1970年代に入りインターロイキン(IL)に関する研究報告がなされるようになり、これが免疫応答における細胞間相互作用に重要な役割を演じる可溶性因子の一つである事が明らかにされてきた<sup>1-5)</sup>。すなわち、ヒト・マウスの Mφ 系細胞に由来し、分子量1200~1800ダルトンの物質であり、Gery<sup>1-3)</sup>により「lymphocyte activating factor (LAF)」と呼ばれたものである。IL-1 は  $Ly1^{+}2^{-}3^{-}$  T 細胞に作用して、第一シグナルである抗原やマイトジェンと共に第2シグナルに働き、その結果 IL-2 が産生される。IL-2 は T 前駆細胞の分化及び活性化され

た T 細胞の増殖を促す作用を行う。また、IL-1 は多くの細胞に作用し、インターフェロンの誘導をも引き起こす。このことから、広い意味での炎症性の生体防御機構に重要な働きをするモノカイン—サイトカインと捉えられている<sup>1-3)</sup>。

著者はこれまで、A型インフルエンザのマウス馴化株の作成に成功<sup>6)</sup>し、血中インターフェロン(IFN)の病原性への関与について明らかにした<sup>7)</sup>。さらに免疫応答への影響を知る目的で、肺内 IFN と IL-1 活性について馴化株、非馴化株を用いて比較検討し、以下の知見を得た。

### 材料及び方法

ウイルス株：カモ由来 swine 型インフルエンザウイルス A/duck/涌谷/19/77 (Hsw<sub>1</sub>Nav<sub>4</sub>) を非馴化ウイルス (Passage 0 : P0) とし、マウスで10代継代した株をマウス馴化株 (Passage 10 : P10) とした。マウスでの継代は感染2日目のマウス肺の10%ホモジネイト上清を次の継代に使用した。継代には DDI マウスを用いた。

マウス：DDI, DDY 雄マウス, 5～6週齢を用いた。

感染方法：エーテル麻酔下で、0.05 ml の経鼻接種によった。接種量は  $10^{6.5}$  EID<sub>50</sub>/ml であった。

肺内細胞の分離：マウス当たり 5 ml の PBS を用いて、気管支より肺を洗浄した。1100 rpm, 7分 で遠心分離することにより、細胞を分離した。上清はインターフェロン測定に使用した。

インターフェロンの測定：感染マウス肺を PBS で 20% のホモジネイト液を作り、その上清を 0.1% になるように鶏赤血球で 3 回処理し、遠心後、その上清を試料とした。さらに上述の肺洗浄液についても同様の鶏赤血球処理をした。これらの試料を L929 細胞における VSV プラーク減少法<sup>8)</sup> により定量した。

IL-1 の測定：肝ホモジネイト液をさらに透析にかけ試料とした。IL-1 の検定は熊谷らの胸腺細胞を用いての <sup>3</sup>H-Thymidine の取り込みによる方法<sup>9)</sup> により検定した。

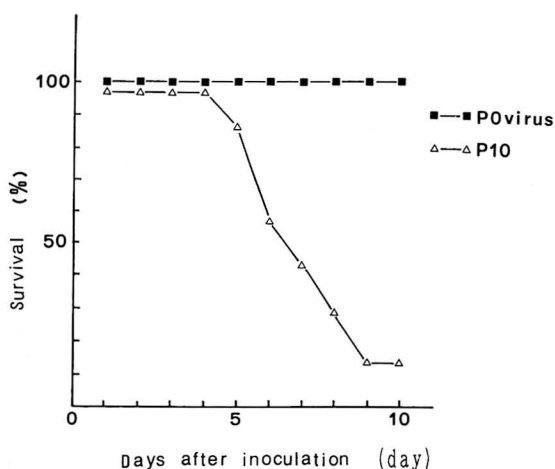


Fig. 1. Survival of mice infected P0 and P10 virus.

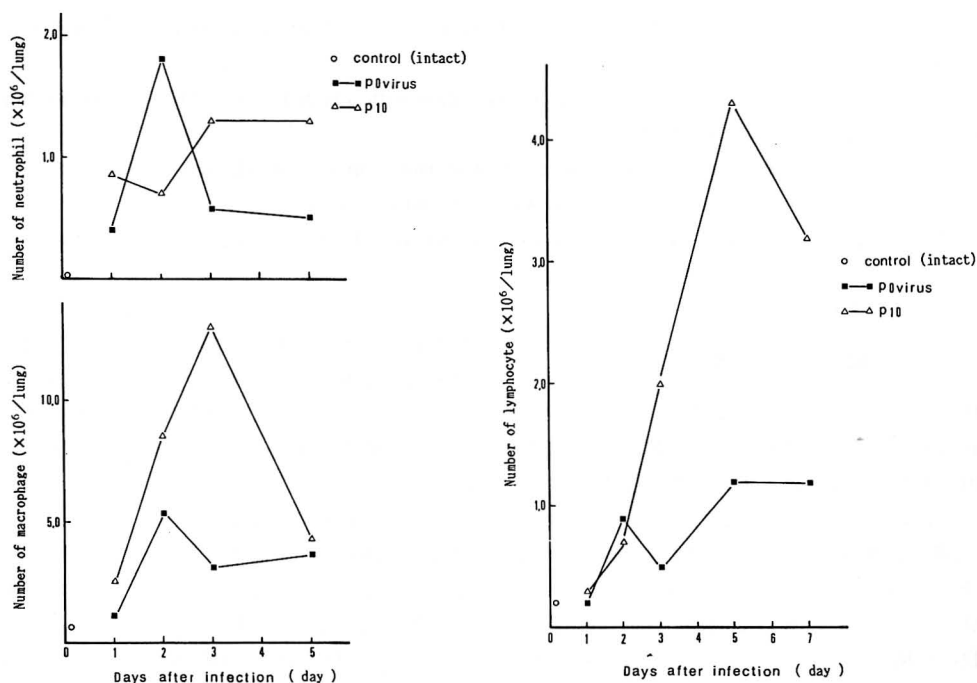


Fig. 2. Cellular changes in lungs of mice infected with P0 and P10 virus.

統計的分析のプログラムとしては、SAS の GL プロシージャーを用いた。

## 結 果

### 1. 非馴化株 (P0) および馴化株 (P10) によるマウスの生存率

Fig. 1 に両ウイルス株感染による生存率が示されている。つまり、非馴化株では10日間の観察を通じて死亡するマウスは認められなかった。他方、馴化株の感染により5日目より死亡するマウスが認められ、6日、7日、8日および9日目で、それぞれ生存率は、57、43、29、および14%と低下した。

### 2. マウス肺内の細胞数の変動

P0 および P10 ウィルス感染後のマウス肺内の細胞数の増減を Fig. 2 に示した。好中球は P0 ウィルス感染により2日目にピークが認められるが、3～5日で低下する傾向を示した。他方、P10 ウィルス感染では2日目では少ない数であるが3～4日目で多数が肺内で認められた。マイクロファージは両ウイルス共1～2日で数が増加し、P0 ウィルス感染では3日目で多数の増加が認められたが、5日目では大幅に減少した。一方、リ

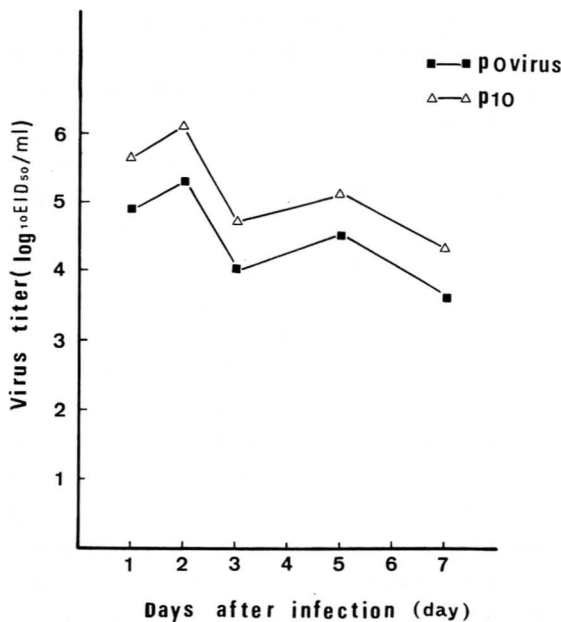


Fig. 3. Virus level in the lungs of mice infected with P0 and P10 virus.

ンパ球は P0 ウィルス感染後、やや増加傾向で推移するが5日でプラトーに達する。P10 ウィルス感染では3日目より急激に増加し、5日目でピークに達する。

### 3. 肺内ウィルス量

両ウイルス感染後の肺内ウィルス量は Fig. 3 に示した通りである。P10 ウィルス感染マウス肺内の量が P0 ウィルス感染の場合と比べてわずかに高い傾向を示した。両ウイルス共、感染1～2日目で高く、その後次第に低下した。

### 4. 肺内インターフェロン量

感染マウス肺ホモジネイト遠心上清中の IFN 量を測定した (Fig. 4)。P10 ウィルス感染により産生される IFN は、感染1日目より検出され、3日目にピークに達

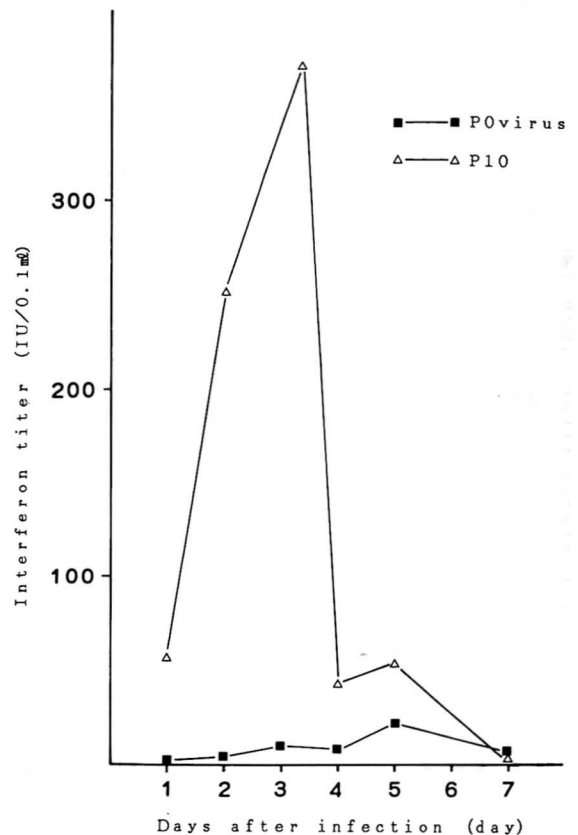


Fig. 4. Interferon activity in the mouse lung by the infection with adapted and non adapted virus.

し、5～7日と減少した。他方、P0 ウィルス感染では、IFN は2日目より検出されるが、その量は4日目まで低く、5日目にピークに達したが、その産生量は2日目および3日目でP10の場合と比べて有意に低かった。（ $P < 0.05$ ）

### 5. 肺気道内インターフェロン量

感染マウス肺気道内洗浄液中の IFN 量を測定した（Fig. 5）。P10 株感染による IFN 量は、2日目ですでにピークに達し、以後次第に低下した。他方、P0 株感染の場合も同様に2日目にピークに達し、3～5日と同様な量で推移するが、その値はP10株と比べて低い値であった。

### 6. マウス肺内での IL-1 産生量

感染マウス肺内の IL-1 産生量は Table 1 に示す通り

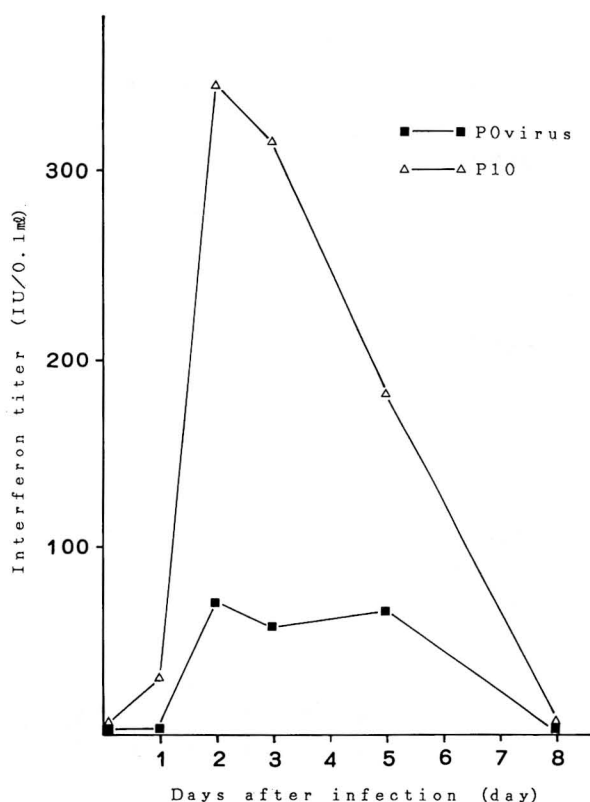


Fig. 5. Interferon activity in lung lavage fluids by the infection with adapted and non adapted virus.

Table 1. IL-1 activity of lung homogenate supernatants after the infection with P10 and P0 Virus.

Virus	Time after infection (day)	Uptake of [ <sup>3</sup> H] TdR (cpm)
Medium control		1850
P0	1	3400
	3	5430
	5	3200
P10	1	13300
	3	2950
	5	6500

であった。P10 株感染の場合には、感染1日目に高い活性が検出され、3日目に低下し、5日目に再び上昇する結果であった。他方、P0 株感染の場合には、感染1日目で検出され、3日目にピークに達し、5日目で低下するが、その活性はP10株と比べて低い値であった。

### 考 察

インフルエンザウィルスをマウスで継代することによりその病原性が増強され、感染マウスを死に致らしめることが以前から明らかになっていた<sup>10)</sup>。しかし、その要因については十分に解明されていない。特に免疫機構については不明な点が多く残っている。これまで著者は、インフルエンザウィルスのマウス馴化株を作成し<sup>6)</sup>、病原性の増強にインターフェロンが関与していることを明らかにしてきた。さらに本報告により、感染後マウス肺に動員される細胞の内、マクロファージが特に馴化株感染により急激に増加し、その後リンパ球が肺に集まる一連の現象より、次のような仮説が成り立つ。つまり、インフルエンザウィルスマウス馴化株感染により、多数のマクロファージが肺に動員され、IL-1が多量に産生され、IL-1は多くの細胞に作用して、インターフェロンが多量に産生される。このインターフェロンはウィルス増殖を抑制すると共に免疫機構をより活発化させる。また、マクロファージやT-細胞らが多数肺細胞内に浸潤することよりコンソリデーションが発生し、いわゆる過剰免疫によりマウスは呼吸困難となって死に致る。そこで本報告の結果をみると、Table 1で示す通り、馴化株感染により、すでに感染1日目で多量のIL-1活性が認められる。また、Fig. 4およびFig. 5で示すごとく、肺内のインターフェロン量は2日目および3日目に

ピークに達しており、これは IL-1 が肺内に浸潤してきた細胞群に作用し、インターフェロンの多量の産生を促していることを推測させる。一方、Fig. 3 より、P0 および P10 株感染マウス肺中のウィルス量に差がないのは、P10 株感染により増殖したインフルエンザウィルスが、肺内で産生されるインターフェロンにより抑制された結果であろうと考えられる。よって、馴化株感染によるマウスの死は、ウィルス増殖の結果とは考えられなく、むしろ IL-1 が引き金となる細胞性の過剰免疫であると推察される。つまり、上述の仮説を裏付ける結果とすることができる。インフルエンザウィルスの馴化現象は、マクロファージを活性化する方向に変異が進行した結果、マウスを死に致らしめるようになることが結論付けられた。なお、好中球については肺に集まる細胞数も少なく、重要な役割はしていないと考えられる。かつてヒトの間で流行し、多数の死亡者を出したスペイン風邪の大流行も、マウスの場合と同様に、ヒトからヒトに感染を繰り返すことにより、ヒトを死に致らしめる方向にウィルス変異が進行した結果ではないかと推測される。

### 要 約

カモ由来 swine 型インフルエンザウィルスをマウス肺で継代して得たマウス馴化株と非馴化株を用いて、馴化現象を解明する目的から感染マウス肺内インターフェロンおよび IL-1 活性について比較検討し、以下の知見を得た。

1. ウィルス感染後、マウス肺内に浸潤する細胞は増加した。特に馴化ウィルス株感染においては、マクロファージが3日目にピークを示し、その後リンパ球が5日目に高い値を示した。他方、非馴化株感染においては馴化株と比べて少ない数の細胞しか認められなかった。

2. 馴化株および非馴化株感染マウス肺中のウィルス量は、両株共感染後2日目にピークを示し、その後低下

した。両株間に有意な差は認められなかった。

3. 馴化株と非馴化株の感染により産生される肺内インターフェロン量に明らかな差が2日目および3日目に認められた ( $P<0.05$ )。両株感染によるインターフェロン産生のピークは馴化株では3日目、非馴化株で5日目であった。

4. 肺洗浄液中インターフェロン量は、馴化株で1日目に低いものの、2日目・3日目で高くなった。これに比べて、非馴化株では1週間を通して低い量であった。

5. 馴化株と非馴化株の IL-1 活性について比較検討した結果、馴化株においては、感染1日目に非常に高い活性が認められ、3日目で低下し、5日目で再び上昇があった。一方、非馴化株では1日目から5日目まで低い活性しか認められなかった。

### 文 献

- 1) Gery, I., R. K. Gershon and B. H. Waksman (1972) J. Exp. Med., 136:128-142.
- 2) Gery, I. and B. H. Waksman (1972) J. Exp. Med. 136:143-155.
- 3) Gery, I. and R. E. Handschumacher (1974) Cell Immunol. 11:162-169.
- 4) Hoffmann, M. D. and J. Watson (1979) J. Immunol. 122:1371-1375.
- 5) Togawa, A., J. J. Openheim and S. B. Mizel (1979) J. Immunol. 122:2112-2118.
- 6) 戸津川清(1991)山形大学紀要(農学). 11:279-283.
- 7) 戸津川清(1992)山形大学紀要(農学). 11:463-466.
- 8) Koi, M., M. Saito, T. Ebina and N. Ishida (1981) Microbiol. Immunol. 25:565-574.
- 9) 熊谷勝男(1983)医学のあゆみ. 126:401.
- 10) 小笠原一夫(1961)日新医学. 48:223-231.